

(TRANSLATION)

KOREAN PATENT GAZETTE

Date of Patent Gazette: 1999.01.15
Date of Registration: 1998.09.19 Patent No. P0165836
Filing Date: 1995.12.29 Appln. No. P1995-072242
Laid-Open Date: 1997.07.26 Pub. No. P1997-043064
Applicant: Daiichi Seito Kabushiki Kaisha
Inventors: Lee, Jin-Ho
O, Yun-Seog
Kim, Chang-Gyeom
Shim, Jae-Ig
Han, Jong-Gweon
Jeong, Seong-O
Jeon, Yeong-Jong

[Title of the Invention]

METHOD FOR PRODUCING GLUTAMIC ACID, GENE RECOMBINATION
RECOMBINATION PLASMID AND MICROORGANISM

Translation of Pertinent Description (Claim 1)

A method for producing glutamic acid characterized in that a gene encoding enzyme trehalase is introduced into a vector; a glutamic acid producing strain is transformed with the produced recombinant plasmid; and trehalose, which is a by-product, is decomposed by trehalase produced by culturing the recombinant strain.

(19) 大韓民国特許庁 (KR)
(12) 登録特許公報 (B1)

公告日付 1999. 01. 15
登録日付 1998. 09. 19.
出願日付 1995. 12. 29.
公開日付 1997. 07. 26.
出願人 第一製糖株式会社
発明者 Lee, Jin-Ho
O, Yun-Seog
Kim, Chang-Gyeom
Shim, Jae-Ig
Han, Jong-Gweon
Jeong, Seong-O
Jeon, Yeong-Jong

登録番号 特0165836
出願番号 特1995-072242
公開番号 特1997-043064

[発明の名称]

グルタミン酸の製造方法、遺伝子組換えプラスミド及び微生物

[実施例 1]

[トレハラーゼ (trehalase, treA) 遺伝子のクロニング]

(1) 大腸菌NM522微生物染色体DNAの分離及び大腸菌NM522/pECCG117の形質転換体からpECCG117の分離

大腸菌NM522菌株を表2に示した組成のSOC培地50mlで37℃、18時間振盪培養して遠心分離で菌体を回収し、リソチーム(10mg/ml)及びRNase含有のTE溶液(10 mM トリス, Cl, 1mM EDTA, pH8.0) 5mlを懸濁させて氷で15分間放置後、10% SDS 300 μ lを入れて37℃、30分間放置後、プロテイナーゼ K (20mg/ml) 30 μ lを入れて37℃、1時間反応後、同一の体積のフェノール/クロロホルムを添加後、長時間非常に徐々に混ぜてから遠心分離後上澄液を5M塩化ナトリウム1/7体積、2倍のエタノールを添加後、氷で10分間放置させて遠心分離した後、70%エタノールで沈澱液を洗ってからTE溶液に溶かした。ここに、塩化セシウムをml当り

1gずつ添加し、1mlのエチジウムブロマイド(EtBr)濃縮液(10mg/ml)を混ぜ、この混合液を超高速遠心分離器(ultracentrifuge)を使用して15℃、50,000rpmで48時間遠心分離させた後、注射器を使用して染色体DNAを取った。イソプロピルアルコールで3乃至4回処理してエチジウムブロマイドを除去した後、TE緩衝液

(10mM トリス(pH 8.0)、1mM EDTA)で24時間透析して染色体DNAを分離精製した。

シャトルベクターpECCG117(カナマイシン耐性、5.8kb)は、KFCC-10674菌株からシャトルベクターpECCG1を分離し、大韓民国特許公告第92-7401号に記載された方法により製造した。このシャトルベクターは形質転換株の大腸菌NM522/pECCG117から次の工程により分離精製した。表2のSOC培地で37℃、18時間振盪培養して遠心分離で菌体を回収し、溶液I(50mM グルコース、25mM トリス Cl(pH 8.0)、10mM EDTA(pH 8.0))を25ml入れて懸濁させた後、溶液II(0.2N NaOH、1% SDS)50mlを入れて徐々に混ぜてから、5分間放置後溶液III(5M カリウム酢酸60ml、氷酢酸 11.5ml、H₂O 28.5ml)37.5mlを添加して混ぜてから、氷で10分間放置後遠心分離した。ガーゼでフィルタした遠心分離の上澄液に2倍のエタノールを添加し、氷で10分間放置させてから遠心分離した後、沈澱物を70%エタノールで洗ってから真空状態で乾燥させた。ここに、10ml TE(pH 8.0)で溶かした後、塩化セシウムをml当り1gずつ添加し、1mlのエチジウムブロマイド(EtBr)濃縮液(10mg/ml)を混ぜ、この混合液を超高速遠心分離器を使用して15℃、50,000rpmで48時間遠心分離させた後、注射器を使用してプラスミドDNAを取った。イソプロピルアルコールで3乃至4回処理してエチジウムブロマイドを除去した後、TE緩衝液(10mM トリス(pH 8.0)、1mM EDTA)で24時間透析してプラスミドDNAを分離精製した。

[表 2]

SOC培地

成 分	1-L基準
グルコース (1M)	20ml
トリプトファン	20g
酵母エキス	5
塩化ナトリウム	0.5
	(pH 7.0)

(2) プライマー製作

現在、大腸菌のトレハラーゼ遺伝子塩基序列が明らかになっている。この中でトレハラーゼ遺伝子を含む5' 部位のプライマーAと3' 部位のプライマーBを合成した。また、プライマーA及びBに各々制限酵素SmaH I 切断部位及びEcoRV切断部位の塩基配列を添加して合成した。DNA合成は、Applied Biosystems社の392 DNA/RNA合成器を使用した。

ープライマーA (24mer)

GGA AGT CCG GGA TCC ACA GCG CCC

BamH I

ープライマーB (24mer)

AGC TAT GGT GAT ATC TGC CGA CAA

EcoRV

プライマーの精製は、合成されたプライマーを55℃で12～18時間放置した後、1/3体積の蒸留水を添加してから、同一の体積の1-ブタノールを3又は4回添加しながら濃縮させた後、真空状態で遠心分離しながら乾燥させてから、蒸留水を適当量添加してスペクトロメーターを使用して波長280～200nmでスキャン

グしながら濃度を定量化した後、最終的にプライマーの濃度を100pmol/ μ lに合わせる。

(3)PCRを利用したトレハラーゼ遺伝子の増幅

PCR(Polymerase Chain Reaction)のための組成は、下記の表3に示した通りである。

[表 3]

成 分	添 加 量
蒸留水	78 μ l
10x 緩衝溶液	10 μ l
dNTPs (5mM)	4 μ l
プライマーA (100pmol/ μ l)	1 μ l
プライマーB (100pmol/ μ l)	1 μ l
大腸菌 NM522染色体 DNA (制限酵素 BamH I で部分切断)	5 μ l (約200ng)
Vent DNA ポリマラーゼ (2U/ μ l) (New England BioLabs社の製品)	1 μ l
軽光油 (Sigmaの製品)	50 μ l

1x緩衝溶液 (10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、20mM トリス
—HCl (pH 8.8、25℃)、2mM MgSO₄、0.1% トリトン X-100)

PCRは、Perkin Elmer社のDNA Thermal Cycler 480を使用し、反応条件は下記の表4に示した通りである。

[表 4]

周 期	変 性	アニーリング	重 合 化
1 次サイクル	94℃、5分	50℃、2分	72℃、3分
2 次サイクル (25サイクル繰り返し)	95℃、1分	50℃、2分	72℃、3分
最終サイクル	94℃、1分	50℃、2分	72℃、10分

上記した反応組成及び条件で約2.2kbのtreA遺伝子を増幅した。増幅された遺伝子をアガロースゲル上で電気泳動してDNAの大きさを確認した後、プロテイナーゼ(proteinase K 100 μ l/ml、SDS 0.5%、EDTA 5mM)を入れて56℃で30分間反応させた後、フェノール/クロロホルムを処理し遠心分離して上澄液を取った。ここに、1/10体積の3.0M ナトリウム酢酸(pH 4.6)と2倍のエタノールを添加して氷で10分間放置させて遠心分離した後、沈澱物を70%エタノールで洗滌してから真空状態で乾燥した後、TE緩衝液(10mM トリス(pH 8.0)、1mM EDTA)に溶かした。

(4) 遺伝子ライブラリー(genomic library)の製造

実施例1の(3)で合成されたtreA遺伝子源を制限酵素BamIII及びEcoRVで制限酵素緩衝液B(10mM トリス-HCl、5mM MgCl₂、100mM NaCl、1mM 2-メルカプトエタノール、pH 8.0)で37℃、2時間切断し、アガロースゲルで電気泳動してから2.2kbのDNA切片を取った。これをBIO 101社製品のGENE CLEAN II Kitを使用しDNAを分離精製して目的の遺伝子源として使用した。

実施例1の(1)で分離精製したプラスミド pECCG117を制限酵素BamHI及びEcoRVで制限酵素緩衝液B(10mM トリス-HCl、5mM MgCl₂、100mM NaCl、1mM 2-メルカプトエタノール、pH 8.0)で37℃、2時間切断した後、アガロースゲルで電気泳動してから5.8kbのDNA切片を取った。これをBIO 101社製品のGENE CLEAN II Kitを使用しDNAを分離精製した後、treA遺伝子切片と混合してリガーゼ緩衝液(50mM トリス-HCl(pH 7.8)、10mM MgCl₂、10mM ジチオトレイトール、1mM ATP、25 μ g/ml牛の血清アルブミン)でT4 DNA リガーゼで16℃で16時間反応させることによって、遺伝子ライブラリーを製作した。

(5) treA遺伝子のクロニング

大腸菌NM522をSOC培地(表2)で14~16時間培養した後、同一の培地50mlに吸光

度(600nm)が0.1以下となるように接種し、37℃で振盪培養しながら対数期の中間段階で菌体を遠心分離して回収した後、30mlの50mM塩化カルシウムを添加してから氷で30分間放置して遠心分離した後、2mlの50mM塩化カルシウムを入れて形質転換用の菌株として使用した。

この菌株100 μ lと実施例1の(4)で製作した遺伝子ライブラリーDNAを適当量混ぜた後、懸濁液をチューブ(Falcon 2059)に入れて氷で30分間放置させた後、42℃で90分間放置してから直ちに氷で1～2分間置いた後、SOC培地0.9mlを入れて37℃で45分間振盪培養した後、50 μ g/mlのカナマイシンが包含された表2の組成の寒天平板培地に塗抹して1日間培養して生育する形質転換体を得た。この形質転換体からプラスミドを分離してBamH I 及びEcoR Vで二重切断してtreA遺伝子が含まれた組換えプラスミドを確認し、これをpTH53と名付けた。

[実施例2]

[ブレビバクテリウム・フラブム KFCC 10652の形質転換]

表3のC培地で14乃至16時間培養したブレビバクテリウム・フラブム KFCC 10652菌株を500mlの同一の培地に吸光度(600nm)が0.1以下になるように接種し、32℃で振盪培養した後、吸光度が0.3に到達した時ペニシリンを0.15U/mlになるように添加し、吸光度が0.6に到達するまで培養した。この菌体を遠心分離して500mlの1mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)緩衝液で1回、500mlの冷却された滅菌脱イオン蒸留水で1回、20mlの10%グリセロール溶液で2回洗滌した後、2～3mlの10%グリセロール溶液に懸濁させて使用した。この懸濁液を適当量に分けてドライアイスで急速冷凍させた後-70℃で保管すると、形質転換頻度の減少なしに約1ヶ月間使用可能であった。冷凍された菌体の懸濁液を氷の中で徐々に溶かした後40 μ lを取って、ここに実施例1の(5)で製作した組換えプラスミド pTH53を適当量添加してよく混ぜ、電気場衝撃装置(Bio-Rad, Gene Pulser)で1回電気場衝撃を加えた後、1mlのC培地で懸濁して32℃で1時間培養してから、50 μ g/mlのカナマイシンを

含有した表 3 の組成の寒天平板培地で塗抹して2日間培養してpTH53を含有した形質転換体を得た。

[表 5]

C培地

C培地	
酵母エキス	5g/l
ペプトン	10g/l
肉汁エキス	5g/l
塩化ナトリウム	2.5g/l
ブドウ糖	10g/l
ウレア	1g/l
pH 7.0	

[実施例 3]

[形質転換株を利用したトレハラーゼ酵素力価分析]

実施例 1 の (5) 及び実施例 2 で得られた形質変換株からトレハラーゼの酵素活性を測定した。大腸菌の場合、表 4 の最小培地で対数期まで育てた後、遠心分離して菌体を回収し、緩衝液 (10mM トリス, Cl, pH 7.2) で2回洗滌後、再度緩衝液に懸濁し、超音波菌体粉碎器 (ultrasonicator) で菌体を粉碎した後、遠心分離して得られた上澄液を酵素液として使用した。ブレビバクテリウムの場合、表 5 の最小培地で対数期まで育てた後、遠心分離して上澄液及び沈澱物を分離した。上澄液はAmicon製品の濃縮器で濃縮して酵素液として使用し、沈澱物は超音波粉碎器で菌体を粉碎した後、遠心分離して得られた上澄液を酵素液として使用した。トレハラーゼの酵素反応は公知の方法 (J. Biol. Chem. 262, 132 12. 1987) で遂行してHPLCで分析した。その結果は表 6 に示した。

[表 6]

大腸菌用の最小培地

成 分	1-L 基準
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	12.8g
KH_2PO_4	3g
NaCl	0.5g
NH_4Cl	1g
チアミン	100 μg
20%ブドウ糖	20ml
	(pH 7.0)

[表 7]

ブレヴィバクテリウム用の最小培地

成 分	1-L 基準
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5g
ウレア	5g
KH_2PO_4	1g
K_2HPO_4	1g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2mg
ビオチン	50 μg
チアミン	200 μg
グルコース	20g
	(pH 7.0)

[表 8]

トレハラーゼの酵素力価分析

菌 株	非酵素活性 (消耗した μmol トレハラーゼ/ min/mg 蛋白質)
大腸菌NM522の細胞抽出液	13.8
大腸菌MN522/pTH53の細胞抽出物	196
ブレビバクテリウム・フラブム	—(力価確認されなかった)
KFCC 10652の細胞抽出物	—
ブレビバクテリウム・フラブム	—
KFCC 10652の上澄液	—
ブレビバクテリウム・フラブム	15.6
KFCC 10652/pTH53の細胞抽出物	—
ブレビバクテリウム・フラブム	125
KFCC 10652/pTH53の上澄液	—

[実施例 4]

[形質転換株によるグルタミン酸の生産]

C培地を1次種培養培地にしてテストチューブに4mlずつ分株し、121℃で10分間加圧殺菌した後、人工変異株のブレビバクテリウム・フラブム KFCC 10652及び形質転換株のブレビバクテリウム・フラブム KFCC 10652/pTH53菌株を1白金耳ずつ食菌(形質転換株の場合、カナマイシンを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加)した後、30℃で16時間培養して1次種菌液として使用した。下記の表 7 の2次種培地30mlを250ml振盪用フラスコに分株して同一の条件下で加圧殺菌し、ここに5%の種培養液を食菌して180rpmで30℃、20～24時間培養した(形質転換株の場合、カナ

マイシンを50 μ g/ml添加)。3次種培地(表7)を2.6L容量の試験用発酵槽に各1.2Lずつ分株し、121℃で10分間殺菌、冷却し、2次種培養完了液を5mlずつ接種して空気を毎分当り0.5~1.0L供給しながら900rpm、30~37℃で振盪培養した。5L容量の試験用発酵槽に発酵培地(表7)を1.8Lずつ分株し、121℃で10分間殺菌、冷却し、3次種培養液を150mlずつ接種して空気を毎分当り0.5~1.0L供給しながら900rpm、30~37℃で振盪培養した。大数増殖期初期乃至末期[OD 0.15~0.4(x100)]の間にペニシリンを0.3~1.2 μ /ml添加して培養し、培養中の培養液のpHはアンモニア水でpH 7.8になるように継続調節した。培養中の残存糖の濃度が0.5~1.5%になると、殺菌された廃糖蜜又は廃糖蜜と原糖を一定比率に混合した糖を随時供給した。追加の糖蜜又は混合糖と初期の発酵培地に添加された糖の合計が発酵液量の対比15%になるまで継続培養した。完了した培養液は遠心分離した後、適切に希釈してHPLC方法でグルタミン酸及びトレハラーゼの濃度を分析した。その結果は表10の通りである。

[表9]

発酵用の培地

成 分			
グルコース	20g	10g	—
トウモロコシ沈浸物	—	30g	30g
MgSO ₄	0.5g	0.5g	0.5g
FeSO ₄	20mg	10mg	10mg
MnSO ₄	20mg	10mg	10mg
ビオチン	20 μ g	100 μ g	—
チアミン	200 μ g	200 μ g	200 μ g
廃糖蜜	5g	20g(転化糖)	80g(転化糖)
ウレア	1g	2g	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	5g	3g	3g
KH ₂ PO ₄	1g	1g	—
K ₂ HPO ₄	0.5g	0.5g	—
消泡剤	—	若干	若干
	(pH 7.0)	(pH 7.0)	(pH 7.0)

[表 10]

形質転換株によるグルタミン酸の生産

菌 株	グルタミン酸 (g/l)	トレハラーゼ (g/l)
ブレビバクテリウム・フラブム KFCC 10652	110.3	18
ブレビバクテリウム・フラブム KFCC 10652/pTH53	121.5	1.6

請求の範囲

請求項1. 酵素トレハラーゼのコーディング遺伝子をベクターに導入し、生成された組換えプラスミドでグルタメート生産菌株を形質転換させ、この形質転換体を培養して生成されたトレハラーゼにより副産物であるトレハラーゼを分解させることを特徴としてグルタミン酸を製造する方法。

請求項2. 第1項において、形質転換される菌株がブレビバクテリウム・フラブム、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス又はコリネバクテリウム・グルタミクムである方法。

請求項3. 酵素トレハラーゼをグルタメート生産菌株で発現することができる組換えプラスミドpTH53。

請求項4. 第3項の組換えプラスミドで形質転換されたグルタメート生産菌株。